VITAE Academia Biomédica Digital
Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela
Octubre-Diciembre 2011 N°48
ISSN 1317-987X

Artículos

- Modelo matemático unidimensional del efecto de la Calmodulina y SERCA en la difusión del Ca^{2+} citosólico en una célula de músculo liso.
- Introducción
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Referencias

Antonio D´Alessandro-Martínez
adaless@gmail.com
Universidad Central de Venezuela. Facultad de Medicina. Instituto de Medicina Experimental, Laboratorio de Contractilidad Miocárdica. Cátedra de Fisiología, Escuela Luis Razetti/ Universidad Simón Bolívar. Dpto. de Procesos Biológicos y Bioquímicos.

Robert Córdova-Rangel
robertcordova1@gmail.com
Universidad Central de Venezuela. Escuela de Física, Facultad de Ciencias.

Engels D´Alessandro-Cáceres
edalesan@gmail.com
Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela

Fisiología

Modelo matemático unidimensional del efecto de la Calmodulina y SERCA en la difusión del Ca^{2+} citosólico en una célula de músculo liso.

Fecha de recepción: 30/03/2011
Fecha de aceptación: 07/12/2011

Title

Unidimensional Mathematical model of the effect of Calmodulin and SERCA on calcium ion diffusion inside smooth muscle cell cytosol.

Modelo matemático unidimensional del efecto de la Calmodulina y SERCA en la difusión del Ca^{2+} citosólico en una célula de músculo liso.

RESUMEN

La contracción y relajación de la célula muscular lisa está controlada por una variación temporal y espacial de la concentración del ión Ca^{2+} citosólico. Se construyó un modelo físico matemático unidimensional basado en una ecuación de difusión-reacción que describe al transporte del ión Ca^{2+} que se resolvió numéricamente mediante el uso del

paquete computacional COMSOL Multiphysics 3.4® (basado en elemento finito). Se diseñaron experimentos computacionales ("in silico") para la liberación de Ca^{2+} desde 1, 2 y 3 canales de rianodina (RyR) y la acción de las Bombas ATP-ásicas del Retículo Sarcoendoplasmático ubicadas en la membrana del Retículo Sarcoplasmático y reingresa el ión al interior del Retículo. Se analizó el comportamiento espacio-temporal transitorio ("sparks" de Ca^{2+}) y estacionario de la concentración citosólica de Ca^{2+} en lugares muy cercanos a los sitios de liberación y suficientemente alejados de ellos. Se determinó que sólo la acción de bomba ATP-ásica del retículo sarcoplasmático (cuyo flujo de Ca^{2+} fue modelado por la ecuación de Michaelis-Menten) no garantiza el regreso a la concentración basal durante la relajación, razón por la cual se consideró un segundo término de reacción llamado Flujo de Fuga. También se demostró que la difusión del Ca^{2+} alcanza su estado estacionario cerca de 50 veces más rápido que cuando se considera la acción del buffer Calmodulina. Como consecuencia de la liberación impulsiva, la concentración pico de Ca^{2+} en el citosol, es diecisiete (17) veces mayor que la basal. Los cambios transitorios de concentración en puntos cerca del lugar de la liberación ocurren diez (10) veces más rápido que los cambios transitorios en puntos localizados cerca de los extremos del dominio. Se observaron oscilaciones en la concentración del ión Ca^{2+} en algunos puntos específicos del dominio cuando se dispara más de 1 canal de RyR. El tiempo transcurrido para alcanzar el estado estacionario (relajación) está acorde con los descritos en la literatura para una célula de íleon.

Palabras claves: Músculo Liso, Ión Calcio, Derivadas Parciales, Difusión-Reacción, Comsol 3.4®, Elemento Finito.

ABSTRACT

The contraction and relaxation of smooth muscle cells is regulated by a temporal and spatial variation in the cytosolic Ca^{2+} ion concentration. In this work was elaborated one-dimensional physical-mathematical model based in a reaction-diffusion equation that represents Ca^{2+} ion transport. This equation was numerically resolved using software package COMSOL Multiphysics 3.4 ® (based on finite element). It was designed computational experiments ("in silico" experiments) using the release of 1, 2 and 3 Ryanodine Receptors-Channels (RyR) and the action of Ca^{2+} ATP Pump located on sarcoplasmic reticulum membrane that re-entry the ion to sarcoendoplasmic reticulum inside. It was studied transient (Ca^{2+} sparks) and stationary space-temporal behavior of Ca^{2+} cytosolic concentration in locations very near and far enough of liberation sites. It was determined that the sole action of Ca^{2+} ATP Pump (Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATP-asa) does not guarantee the return to baseline concentration at end of relaxation, and thus the action of a second reaction term called Leak Flow was considered. It was also shown that Ca^{2+} diffusion reaches its steady state about 50 times faster than when was considered the Calmodulin buffer. The impulsive release of Ca^{2+} ion permits to obtain a Ca^{2+} concentration peak in the cytosol that is seventeen (17) times the baseline concentration. Transient changes in concentration near of release site occur ten (10) times faster than the transient changes near the ends of the domain. Oscillations were observed in the Ca^{2+} ion concentration in the domain points when were triggered more than 1 channel RyR. The time elapsed to achieve steady state (relaxation) are consistent with those described in the literature for ileum cell.

Keywords: Smooth muscle, Calcium ion, Diffusion-Reaction, Comsol 3.4, Finite Element, Partial Differential Equation.

INTRODUCCIÓN

El incremento transitorio de la concentración del ión Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]$) en el citosol de la célula muscular lisa (CML) tras un estímulo (neurotransmisor acoplado a un receptor, aplicación de voltaje o corriente eléctrica, o bien un estímulo mecánico como el estiramiento de la célula) inicia la contracción muscular. En este proceso está involucrada la liberación del ión desde reservorios intracelulares como el retículo sarcoplásmico, su difusión y su acoplamiento con la proteína denominada Calmodulina en el citosol y finalmente mecanismos de restauración del nivel basal de la concentración citosólica del ión calcio[1,2].

Una vez activados los canales tipo L (canales de dihidropiridina) en el sarcolema, ingresa Ca^{2+} al citosol de la CML desde el medio extracelular (ME) a través de esos canales, o bien se activa el mecanismo "sensor voltage" que acopla los canales tipo L con canales ubicados en la membrana del RS como los canales de Rianodina (RyR) y/o Inositol Trifosfato ambos mecanismos promueven el ingreso de Ca^{2+} al citosol desde el RS (que es un reservorio o cisterna intracelular de Ca^{2+}) a través de los canales de Rianodina y/o Inositol Trifosfato -IP_3-[3,4]. Al aumentar la concentración de Ca^{2+} citosólico aumenta su tasa de unión a la Calmodulina ("buffer") formando el complejo Ca^{2+}-Calmodulina, este activa una proteína denominada Kinasa de la Cadena Liviana de Miosina (MLCK) la cual fosforila a la cadena liviana reguladora de la miosina, y permite así que la miosina se una a la actina y se genere fuerza contráctil[5,2]. Este mecanismo es diferente al que ocurre en músculo estriado (esquelético y cardiaco) en donde el Ca^{2+} libre citosólico difunde hasta la Troponina C ubicada en el sarcómero (unidad contráctil del músculo estriado) iniciando la

contracción muscular. El ión calcio libre es retornado al ME y al RS por la acción de bombas ATP-ásicas ubicadas en el sarcolema (llamadas PMCA) y el RS (denominadas SERCA), respectivamente. También en el sarcolema existen moléculas o proteínas intercambiadoras (transporte activo secundario) que normalmente, en forma acoplada, expulsan Ca^{2+} desde el citosol hacia el ME e ingresan iones Na^{+} en sentido opuesto (contra-transporte), estos mecanismos disminuyen la concentración citosólica de Ca^{2+}, activándose en ese momento una fosfatasa que revierte la fosforilación de la cadena liviana reguladora de la miosina permitiendo la relajación de la célula muscular lisa (separación de la actina y la miosina).

Existen pocas publicaciones sobre el modelaje matemático y la simulación computacional de la difusión-reacción del Ca^{2+} en células de músculo liso, uno de ellos[6] simuló el transporte citosólico del ión en una y dos dimensiones (coordenadas cilíndricas) resolviendo la ecuación en derivadas parciales por diferencia finita. Se incluyeron los procesos más importantes involucrados en la regulación del Ca^{2+} y se demostró que SERCA es el mecanismo más importante a corto plazo en la restauración del nivel basal de la $[Ca^{2+}]$ y la PMCA y el intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} también operan pero son más efectivos a largo plazo.

Otra investigación[7] obtuvo ondas de calcio complejas y formación de patrones usando un autómata celular estocástico cuyas reglas se obtienen de las soluciones (obtenidas por diferencias finitas explícitas) de la ecuación de difusión-reacción correspondiente.

En este trabajo se desarrolla un modelo físico–matemático usando una ecuación de difusión–reacción[4] que permitirá modelar la dinámica espacio-temporal de la $[Ca^{2+}]$ en el citosol en una célula de músculo liso, considerando la participación de un solo buffer

(Calmodulina), esta ecuación se resolvió numéricamente por Elemento Finito[8] utilizando el paquete computacional COMSOL 3.4®[9,10]. Los objetivos de esta investigación son: 1.Elaborar un modelo geométrico unidimensional del sistema a modelar. 2. Identificar las fuentes y sumideros que actúan para regular la [Ca^{2+}] en el citosol de las células musculares lisas. 3. Encontrar la solución numérica para la ecuación de Difusión-Reacción propuesta utilizando COMSOL 3.4® y realizar diversos experimentos "in sílico" (computacionales). 4. Representar gráficamente las soluciones numéricas encontradas. 5. Discutir los resultados obtenidos al modificar diferentes parámetros del modelaje. 6. Comparar los resultados obtenidos con aquellos resultados experimentales previamente publicados.

METODOLOGÍA

Para los experimentos computacionales realizados en este trabajo hemos considerado una línea de 2µm de largo ubicada sobre una parte de la membrana del RS como lo muestra la Figura 1. La [Ca^{2+}] citosólica basal que se utilizó fue de $1{,}19 \times 10^{-4}$ (mol/m^3)[11]. Se pueden observar los escenarios unidimensionales para el esquema de "disparo" de 1, 2 y 3 canales de RyR -o equivalentemente IP_3- (Figura 2), y la ubicación del eje x sobre una parte de la membrana del RS donde se encuentra nuestro dominio unidimensional de observación para la dinámica espacio-temporal de la [Ca^{2+}].

La ecuación en derivadas parciales de difusión–reacción gobernante en el dominio unidimensional es:

$$\delta_{ts} \frac{\partial c}{\partial t} + \nabla \cdot \left(- \mathrm{D} \nabla c \right) = \mathrm{R} \qquad (1)$$

Esta ecuación fue resuelta numéricamente usando COMSOL 3.4®. En esta EDP los símbolos tienen el siguiente significado:

∇ : Operador gradiente.

δ_{ts}: Coeficiente de escalado temporal. Este coeficiente es normalmente de 1. Si se desea, se puede cambiar la escala de tiempo, por ejemplo, de segundos a minutos estableciéndose en 1 / 60.

D: Coeficiente de Difusión. En este trabajo es un escalar que no depende de la posición y del tiempo.

R: Tasa de reacción. Se consideran reacciones que incluyen las siguientes fuentes o sumideros:

1. J_{SERCA}: representa una expresión matemática que considera la acción de las bombas Ca-ATP-ásicas ubicadas en toda la superficie de la membrana del RS. En este trabajo se representó por una ecuación de Michaelis-Menten[12,13], no obstante, también puede usarse una ecuación tipo Hill[14] (denominada también Michaelis-Menten generalizada). Es un término tipo sumidero. En este trabajo se modelo como una única bomba que representa el equivalente de las muchísimas bombas elementales ubicadas en la membrana del RS.
2. J_{FUGA}: es una expresión matemática que se incluye para que la concentración basal citosólica de Ca^{2+} no alcance valores inferiores a su valor basal. Es un artificio para anular J_{SERCA} cuando la $[Ca^{2+}]$ citosólica alcanza su valor basal. Este artificio tiene justificación fisiológica puesto que normalmente la $[Ca^{2+}]$ citosólica durante la relajación nunca alcanza valores inferiores al basal. Este efecto inhibitorio sobre SERCA realmente existe y es regulado por la defosforilación del fosfolambano o moléculas equivalentes, y nos permite inferir que J_{SERCA} efectivo es el que se

obtiene de la suma de J_{SERCA} y J_{FUGA}. Es un término tipo fuente para el ión calcio citosólico.

3. Disparo de RyR2 (ubicado en x = 0.5 μm) y RyR3 (ubicado en x = 1.5 μm). Son términos tipo fuente para el ión calcio citosólico.

Las condiciones de borde impuestas son del tipo Neumann homogéneas[15], es decir, se impone la condición de flujo nulo en los bordes del dominio ($\hat{\mathbf{n}} \cdot \nabla c = 0$).

La condición inicial del modelo se representa como:

$$c(x,0) = RyR(1) + c_{basal}$$

RyR(1) representa el disparo inicial del canal central de RyR, que representaremos matemáticamente mediante la delta de Dirac[16]:

$$RyR(1) = A\ \delta(x\text{-}x_0)$$

centrada en el centro del canal, pero utilizar esta expresión matemática genera problemas computacionales, entre otros, inestabilidades y artefactos en la solución numérica por lo cual usamos la representación gaussiana[17,18] de la delta de Dirac, por tanto la condición inicial se representará como:

$$c(x,0) = \frac{A_x}{\sqrt{2\pi}\sigma_x}\ e^{-\frac{(x-x_i)^2}{2\sigma_x^2}} + c_{basal} \qquad (2)$$

En este trabajo supondremos que la activación del primer canal de RyR (o IP_3) se debe al cambio conformacional en el canal tipo L (ubicado en el sarcolema) que ocurre cuando la onda despolarizante lo alcanza ("sensor voltaje"), y su acoplamiento mecánico con el canal de RyR (o IP_3) permite la apertura de este último[4]. Si se supone que el mecanismo dominante es el de calcio liberado por calcio[4], entonces se debe sustituir c_{basal} por el umbral de disparo (c_{umbral}) del primer receptor que en principio debe ser mayor que c_{basal}, aún cuando debe ser considerada la dependencia con el retardo entre la elevación local y

transiente de la [Ca^{2+}] muy cerca del RyR (o IP_3) y su apertura efectiva. La magnitud A_x fue seleccionada apropiadamente para liberar cantidades fisiológicas de iones Ca^{2+} hacia el citosol (Ver Cuadro 1) y σ_x fue seleccionada para cumplir la condición (σ_x/L) <<1 que confina apropiadamente la liberación a un intervalo muy estrecho del dominio centrado en x_1.

La Ecuación de Difusión-Reacción a resolver numéricamente por Comsol® (Elemento Finito) es la Ecuación en Derivadas Parciales (EDP):

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \left(\frac{D_c}{1+\Theta}\right)\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{J}{1+\Theta} \quad \text{con } \Theta = \frac{B_t K_d}{(K_d + c)^2} \qquad 0 \le x \le 2\mu m \tag{3}$$

$$J = - J_{SERCA} + J_{FUGA} + J_{RS}$$

$$J_{SERCA} = \frac{r\,c}{K_c + c} \tag{4}$$

$$J_{FUGA} = -J_{SERCA}(c = c_o) \tag{5}$$

$$J_{RS} = \frac{A_x}{\sqrt{2\pi}\sigma_x} e^{-\frac{(x-x_0)^2}{2\sigma_x^2}} \cdot [H(t-a) - H(t-b)] \tag{6}$$

Donde $K_d = K_-/K_+$, K_- y K_+ son las constantes de velocidad inversa y directa de la reacción Ca^{2+}/Calmodulina, respectivamente y *H(t)* es la función escalón de Heaviside[16] y [*H(t-a)-H(t-b)*] indica que J_{RS} es diferente de cero en el intervalo temporal [a,b]. *H(t-a)* representa la apertura del receptor-canal de RyR en t=a. Para obtener la ecuación (3) se han hecho las siguientes aproximaciones:

i. Cinética de buffer rápido, donde se considera que K_+ y K_- son muy grandes comparadas con el tiempo que tarda el Ca^{2+} en reaccionar con la Calmodulina.

ii. El coeficiente de difusión de la Calmodulina (D_b) es mucho menor que la del Ca^{2+} (D_c).

Los valores de las constantes utilizadas se presentan en la Tabla 1. Se aplicó el método de Elemento Finito (EF) para lo cual se dividió el dominio en 30 elementos (segmentos) del tipo Lagrange-Cuadráticos, la tolerancia relativa fue de 0,01 y la absoluta de 0,001. Se aplicó la versión de Galerkin[8]. La técnica del Elemento Finito en su versión Galerkin permite reducir una EDP a un sistema de Ecuaciones Diferenciales Ordinarias (EDO) que al ser discretizadas (usando por ejemplo un esquema de Diferencia Finita) se convierte en un sistema de ecuaciones algebraicas que puede ser resuelto usando UMFPACK que es un el submódulo de COMSOL 3.4 ® que realiza cálculos con grandes arreglos originalmente lineales o linealizados para encontrar la solución de dicho sistema. El usuario de COMSOL 3.4 ® al ubicarse en el Módulo Multiphysics, tiene la opción de activar el paquete UMFPACK al hacer "clic" en la tecla correspondiente en una ventana llamada solver".

RESULTADOS

1. Difusión Pura con condición inicial $c(t_0) = 0$ mol/m^3

Nuestro primer experimento lo realizamos sin liberación impulsiva de Ca^{2+}, verificamos que al no existir gradiente de concentración (porque no hay liberación de Ca^{2+} a través de ningún canal de RyR entonces la concentración citosólica permanecerá invariable, igual a c_{basal}) no existe difusión como lo predice la Ley de Fick[18]. Por otro lado, este experimento permite comprobar parcialmente el adecuado funcionamiento del paquete computacional utilizado.

2. Difusión Pura (sin presencia de: Calmodulina, J_{FUGA} y J_{SERCA}) con el disparo del canal central de RyR en t = 0 s.

En este experimento se muestra la difusión pura para una liberación inicial impulsiva tipo gaussiana, que representa el ingreso de Ca^{2+} al citosol desde un canal localizado en la mitad del dominio (x = 1μm) para t = 0 s; se puede observar en la Figura 3B que la gráficas para la concentración del ión en función de la posición y el tiempo, tienen un comportamiento similar al encontrado para la solución analítica[18] de la ecuación de difusión pura con condición inicial c(x,0) = δ(x) y dominio infinito (Fig. 4B), aún cuando en este trabajo se resolvió la ecuación de difusión para un dominio finito, estas soluciones son similares debido a que la dispersión de la gausiana (σ_x) que representa el disparo inicial cumple con la condición $(\sigma_x/L) << 1$, más exactamente, los puntos alejados del centro de la gaussiana (centro del canal de RyR) no están influidos por la liberación impulsiva de Ca^{2+} sino cuando ha transcurrido un tiempo muy largo.

La Figura 3C nos muestra que la difusión alcanza su estado estacionario (EE) luego de aproximadamente 3 ms de iniciado el disparo, y que la concentración de Ca^{2+} en el citosol ($\approx 1{,}7.10^{-4}$ [mol/m^3]) está por encima de la concentración basal ($1{,}19.10^{-4}$ [mol/m^3]). Por esta razón se deberá incluir en nuestro modelo el flujo de SERCA (J_{SERCA}) y el flujo de FUGA (J_{FUGA}), los cuales sumados evitan que una vez alcanzada la concentración basal de $[Ca^{2+}]$ disminuya. También podemos observar que el tiempo que tarda la difusión en alcanzar un estado estacionario (3 ms), es muy corto en comparación con el tiempo de duración del "spark" de Ca^{2+} encontrado en el músculo liso (guinea pig) por microscopía confocal[19], el cual está entre 150 y340 ms[20]. La corta duración de la difusión encontrada

por nosotros se debe al hecho (como se demostrará luego) de no haber considerado la acción del buffer Calmodulina.

Obsérvese que la escala de tiempo usada para evidenciar los cambios en la concentración citosólica de Ca^{2+} en puntos alejados del sitio de liberación es 10 veces mayor (10^{-4}s) que la usada para evidenciar los cambios en locaciones más cercanas al sitio de liberación (10^{-5}s).

Respecto al cambio de la concentración citosólica de Ca^{2+} se pasa de la concentración basal ($1{,}19.10^{-4}$ [mol/m^3]) a un pico de concentración en el sitio de la liberación de $2{,}11.10^{-3}$ [mol/m^3], es decir, aproximadamente 17 veces mayor que la concentración basal; después de alcanzado el EE se observa que la concentración citosólica es aproximadamente 1,4 veces mayor que la concentración basal.

Las Figuras 4A,B,C son gráficos de la solución analítica de la Ecuación de Difusión Pura para un dominio infinito, condiciones de borde tipo Dirichlet y liberación impulsiva en el centro del intervalo. La similitud morfológica con las Figuras 3A,B,C es evidente, no obstante, que estas últimas representan gráficos de la solución numérica para un dominio finito con condiciones de Neumann (flujo nulo de iones calcio en los extremos del intervalo de difusión). Debido a que se han utilizado coeficientes de Difusión y cantidad de iones calcio liberados al citosol diferentes, la escala temporal difiere en varios órdenes de magnitud.

3. Difusión-Reacción con: i) Disparo del canal central de RyR en t=0 s, ii) Acción de la Calmodulina (40, 30 y 10μM) y $D_{ef} = Dc / (1+ \Theta)$, iii) Acción simultánea de J_{SERCA} y J_{FUGA}.

Con una concentración citosólica de Calmodulina igual a 40 μM, el comportamiento de la concentración del ión Ca^{2+} debido a la liberación de Ca^{2+} desde un único canal de RyR central (x=1μm), considerando la acción de la Calmodulina y el efecto de J_{SERCA} y J_{FUGA}, observamos que el tiempo para alcanzar el EE es del orden de 300 ms (Figura 6C). Las concentraciones en los puntos cercanos y alejados del canal alcanzan su máximo por debajo de los 50 ms. Existe un buen acuerdo entre el tiempo para alcanzar el EE obtenido en este experimento y los valores publicados previamente (Ver Figura 5) para la duración de un "spark"[21,22] de músculo liso[20]. Para concentraciones de Calmodulina inferiores a 40 μM, por ejemplo, 30μM, el tiempo para alcanzar el EE es del orden de 200 ms (Figura 6E) y para 10μM es del orden de 90 ms (Figura 6D), lo cual evidencia el efecto retardador sobre la difusión de la Calmodulina.

4. Difusión-Reacción con i) disparo de un segundo canal de RyR por la acción de la difusión de Ca^{2+} luego del disparo del canal central en t=0 s, ii) Calmodulina (40 μM) y $D_{ef} = Dc / (1+ \Theta)$, iii) Acción simultánea de J_{SERCA} y J_{FUGA}.

El disparo de un canal de RyR puede activar el disparo de otros canales de RyR cercanos los cuales son más sensibles a los cambios de la $[Ca^{2+}]$ que el canal central (es un hallazgo experimental), es decir, los receptores RyR laterales se disparan con un umbral de concentración de Ca^{2+} menor (y también liberan menor cantidad de Ca^{2+} al citosol). En este experimento definimos un umbral de concentración para el segundo canal de RyR ubicado en x=0.5μm, como el máximo valor de la concentración de Ca^{2+} alcanzando en el proceso

de difusión para un solo canal central de RyR, en la posición del segundo canal, lo cual ocurre para t = 15ms. Ver Figura 7.

En la Figura 8C, se puede observar que la línea verde (x = 0.5µm) inicialmente no se hace evidente porque tiene superpuesta la línea azul clara (x = 1.5µm) ya que estas locaciones se encuentran equidistantes del centro y por lo tanto la concentración tiene idénticos valores debido al carácter simétrico de la difusión desde el canal central, luego se observa que el canal de RyR en x = 0.5µm es activado en el momento en el cual la concentración alcanza su máximo. Cuando el segundo canal deja de liberar Ca^{2+}, el proceso de difusión y la acción de J_{SERCA} disminuyen rápidamente el valor de la $[Ca^{2+}]$ en la locación x = 0.5µm. Se observa también que para locaciones alejadas del segundo canal (1.5µm y 1.75µm) el disparo del segundo canal no afecta de manera significativa la $[Ca^{2+}]$ lo cual se debe a la acción de J_{SERCA} que va atenuando el incremento de la concentración debido a este segundo disparo. Se observa que para el punto x =0.75µm ubicado entre los RyR1y RyR2, está presente una oscilación en la $[Ca^{2+}]$.

5. Difusión-Reacción con i) Representación del disparo de dos canales de RyR por la acción de la difusión de Ca^{2+} luego de un disparo inicial en t = 0 s, ii) Calmodulina (40µM) y $D_{ef} = Dc / (1+ \Theta)$, iii) Acción simultánea de J_{SERCA} y J_{FUGA}.

En este experimento (Figura 8), observamos el disparo de un canal de RyR central (x = 1µm; 2,1mmol/m^3) en t = 0s, seguido del disparo de dos canales de RyR laterales (x = 0.5µm y x = 1.5µm) de menor intensidad (1,1mmol/m^3) ambos en t=0,015s. En x = 1.5µm (sobre el tercer canal de RyR), ocurre un aumento leve de la $[Ca^{2+}]$, después se aprecia un aumento brusco de la misma debido al segundo disparo. Se observa que para x = 0.75µm (entre los canales 1 y 2 de RyR) la concentración aumenta por el disparo del primer

canal, luego decae por acción de J_{SERCA} y la difusión, luego vuelve a aumentar producto del segundo disparo del canal de RyR de menor intensidad, dando como resultado una oscilación de concentración que luego decae al valor basal. El mismo comportamiento ocurre para x = 1,75 μm, aumenta levemente por la acción del disparo del primer canal (por estar este punto más alejado del canal de mayor intensidad) y luego aumenta por acción del disparo del tercer canal, para finalmente decaer hasta la concentración basal.

6. Difusión-Reacción con i) disparo de tres canales de RyR, el canal central activado en t = 0 s, luego el segundo canal se dispara en t = 0.015s y en x = 0.5μm y el tercer canal se dispara en t = 0.040s y en x = 1.5μm, ii) $D_{ef} = Dc / (1+ \Theta)$, iii) Acción simultánea de J_{SERCA} y J_{FUGA}.

En la Figura 10 C puede apreciarse la curva de concentración vs tiempo para x = 0.5μm (línea verde) la cual en la Figura 9 C, no se observa por la superposición con la línea azul claro ya mencionada. Si los canales 2 y 3 de RyR son activados en tiempos diferentes los valores máximos de la concentración son diferentes (Gráfico 10C), esto se debe a la acción de J_{SERCA}, ya que en el instante en que se activa el canal 3 (x = 1.5μm) el valor de $[Ca^{2+}]$ está por debajo del valor que tenía la $[Ca^{2+}]$ en el momento de activación del canal 2 (x = 0.5μm). Al igual que en el experimento anterior, existen puntos en el dominio (x=0,75μm y x=1,75μm) donde se observan oscilaciones debido a disparos subsiguientes de los canales de RyR cerca del punto de observación. Estas oscilaciones son de menor amplitud cuando la concentración de Calmodulina disminuye desde 40 μM hasta 30 μM (Fig.11B) y 10 μM (Fig. 12B).

CONCLUSIONES

1. El modelo unidimensional elaborado demostró que la difusión de Ca^{2+} sin considerar la acción de la Calmodulina en la difusión del ión Ca^{2+} alcanza su estado estacionario a los 3ms lo cual es muy rápido en comparación con los tiempos mostrados por microscopia confocal para la duración de un spark de Ca^{2+} de músculo liso de ileum de guinea pig que está entre los 150- 340 ms. Al considerar la acción de la Calmodulina con una concentración de 40μM se observó un tiempo de relajación (tiempo en el cual el "spark" alcanza el estado basal o estado estacionario) de aproximadamente 300ms, lo cual está de acuerdo con las medidas experimentales previamente citadas. Para concentraciones de Calmodulina inferiores a 40μM, el efecto retardador de ésta en la difusión del Ca^{2+} es menor.
2. Se realizaron experimentos computacionales "in silico" de difusión-reacción para:

- El disparo de un canal central en t = 0 s, efecto del buffer y la acción de J_{SERCA} y J_{FUGA}, donde se analizó el comportamiento de la concentración en función del tiempo para distintos puntos del dominio, y se determinó que la acción simultánea de J_{SERCA} y J_{FUGA} mantienen la concentración basal de Ca^{2+} cuando la difusión llega a su estado estacionario.

- El disparo de dos canales de RyR, el canal central en t = 0 s y el canal 2 (x = 0.5μm) en t = 0.015s, se observa que para los puntos alejados del segundo canal (x = 1.5μm y x = 1.75μm) el disparo del mismo no cambia el valor de la $[Ca^{2+}]$ porque la acción de J_{SERCA} supera la difusión del segundo disparo.
- El disparo de tres canales de RyR, el canal 1 central (x = 1μm) en t = 0 s, el canal 2 (x = 0.5μm) y el canal 3 (x = 1.5μm) en t = 0.015s. Se analizó el comportamiento de la concentración en función del tiempo para distintos puntos del dominio

observándose oscilaciones debido al disparo del segundo y tercer canal de RyR que luego es atenuado por la acción de J_{SERCA}.

- El disparo de tres canales de RyR, el canal 1 central (x = 1μm) en t = 0 s, el canal 2 (x = 0.5μm) en t = 0.015s y el canal 3 (x = 1.5μm) en t = 0.040s. Se analizó el comportamiento de la concentración en función del tiempo para distintos puntos del dominio observándose oscilaciones de $[Ca^{2+}]$ debido al disparo del segundo y tercer canal de RyR que luego son atenuadas por la acción de J_{SERCA}. Al disminuir la concentración de Calmodulina se atenúan las oscilaciones de $[Ca^{2+}]$.

REFERENCIAS

(1) Guyton, A., Hall, J. (2006). Fisiología Médica. 11ava edición. Elsevier. España.

(2) Koeppen B., Stanton, B. (2009). Fisiología de Berne y Levy. Elsevier-Mosby. España.

(3) Fill, M., Copello, J. Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. Physiol Rev. 82 No.4 (2002) 893 – 922.

(4) Keener, J., Sneyd, J. (1998). Mathematical Physiology. Springer-Verlag. USA.

(5) Pocock, G., Richards, C. (2005). Fisiología Humana. La base de la medicina. 2da edición. Masson S.A. España.

(6) Kargacin, G., Fay, F. "Ca^{2+} movement in smooth muscle cells studies with one -and two-dimensional diffusion models". Biophys. Soc. 60 (1991)1088 – 1100.

(7) Yang, X. Computational modelling of nonlinear calcium waves. Applied Mathematical Modelling. 30 (2006) 200–208.

(8) Hutton, D. (2004). Fundamentals of Finite Element Analysis. Firth edition. McGraw-Hill. USA.

(9) Pryor, R. (2011). Multiphysics modeling using Comsol. John and Bartlett. USA.

(10) Multiphysics User's Guide. (2007). COMSOL 3.4. Comsol Company.

(11) Jaggar, J., Stevenson, A., Nelson, M. Voltage dependence of Ca^{2+} spark in intact cerebral arteries. J Physiol Cell Physiol. 274 (1998) 1755 – 1761.

(12) Eckert, R., Randall, D y Augustine, G. (1989). Fisiología Animal. Interamericana-McGraw-Hill. España.

(13) Montesinos, J. (1998). Modelización de Procesos Biológicos (Capítulo 9). Ingeniería Bioquímica. Godia F. y López J. (Editores). Síntesis. Madrid.

(14) Volkenstein, M. (1985). Biofísica. Mir, Moscú.

(15) Crank, J. (1975). The Mathematics of Diffusion. Oxford. Great Britain.

(16) Rumer, Y. y Ryvkin, M. (1980). Thermodynamics, Statistical Physics, and Kinetics. Mir, Moscú.

(17) Pathria, R. (1972). Statistical Mechanics. Pergamon. Great Britain.

(18) Rubinow, S. (1975). Introduction to Mathematical Biology. John Wiley & Sons. USA.

(19) Launikonis B, Zhou J, Royer L, Shannon Th, Brum G y Rios E. Confocal imaging of $[Ca^{2+}]$ in cellular organelles by SEER, shifted excitation and emission ratioing of fluorescence. J Physiol. 567 No.2 (2005) 523–543.

(20) Gordienko, D., Bolton, T., Cannell, M. Variability in spontaneus subcellular calcium release in guinea-pig ileum smooth muscle cells. J Physiol. 507. No. 3(1998) 707 – 720.

(21) Niggli, E. Localized intracelular calcium signaling in muscle: Calcium Sparks and Calcium Quarks". Annu. Rev. Physiol. 61(1999) 311 – 335.

(22) Cheng, H., Lederer, W. Calcium Sparks. Physiol Rev. 88 (2008) 1491–1545.

FIGURAS

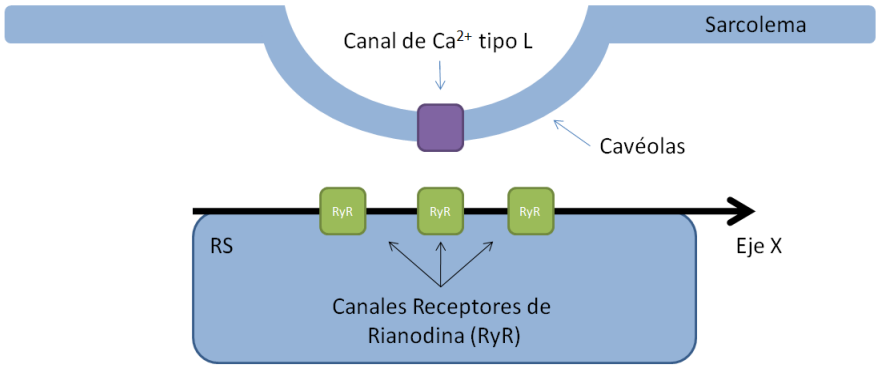


Figura 1: Modelos unidimensionales para el esquema de "disparo" de 1, 2 y 3 canales de RyR

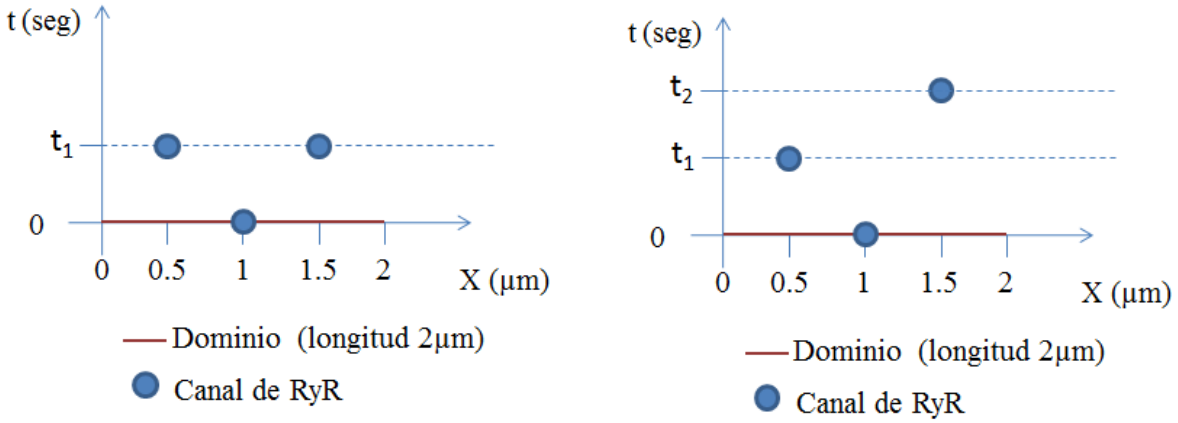


Figura 2: Esquemas de "disparo" de 1, 2 y 3 canales de RyR

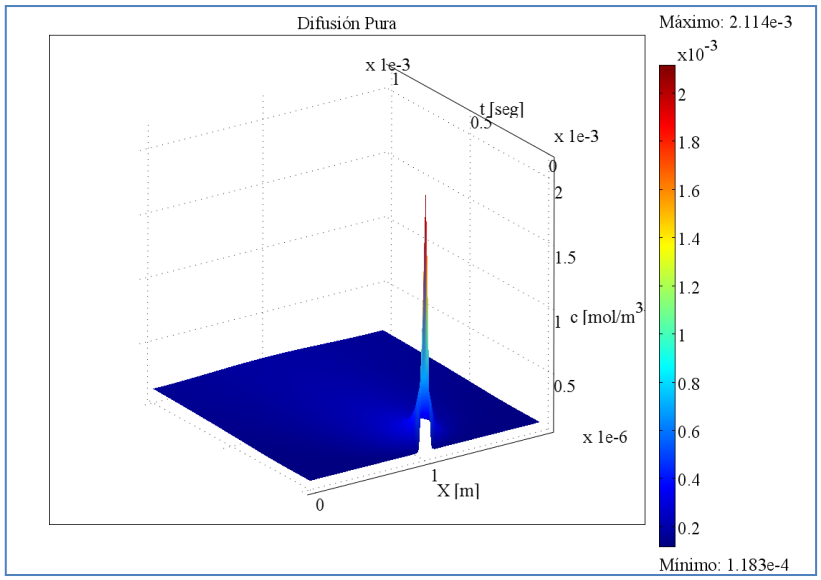


Figura 3A

Difusión Pura para el disparo del canal central de RyR en t = 0s. No está presente la Calmodulina.
Concentración en función de la Posición y del Tiempo

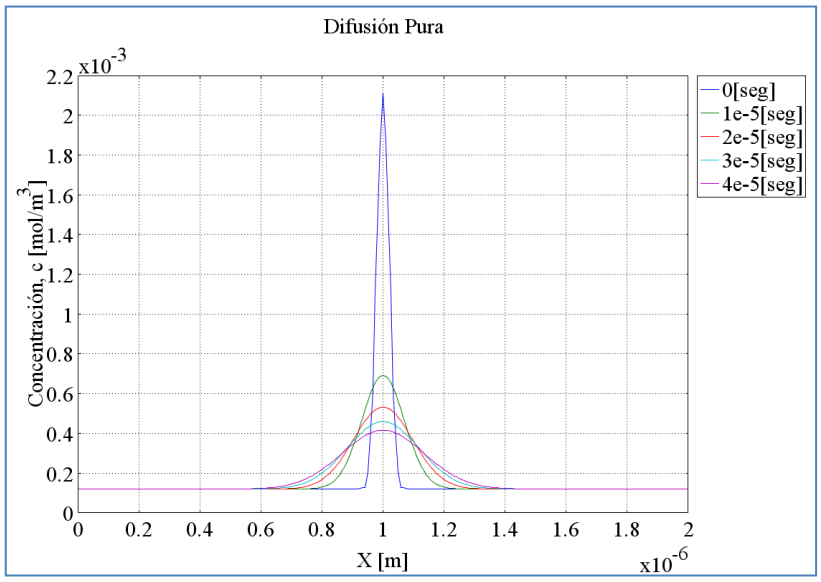


Figura 3B

Concentración vs Posición, en tiempos diferentes

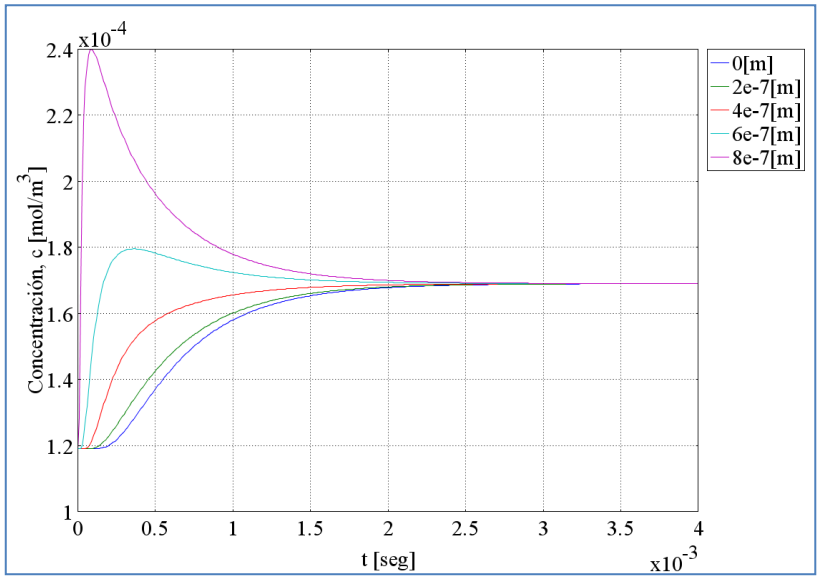


Figura 3C

Concentración vs Tiempo, en puntos diferentes del dominio.

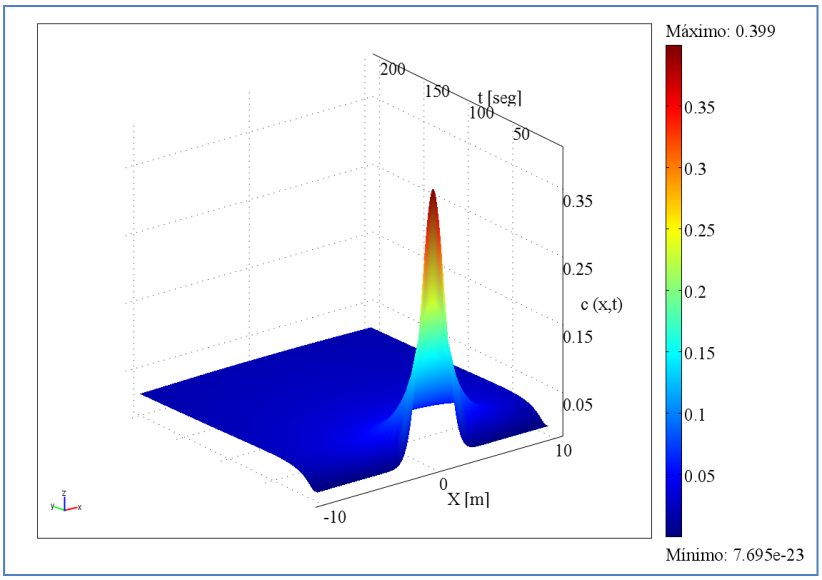


Figura 4A
Solución analítica de la ecuación difusión pura. Concentración en función de la Posición y del Tiempo.

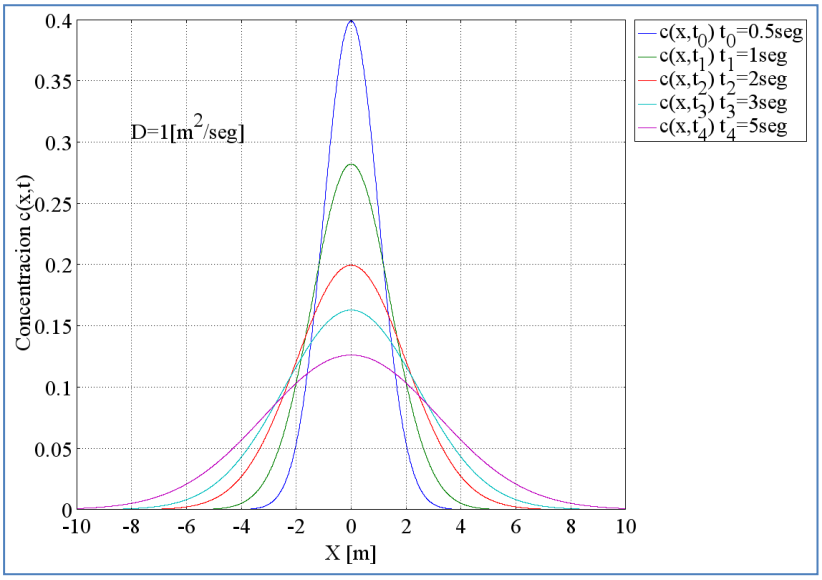


Figura 4B
Concentración Vs Posición para diferentes Tiempos.

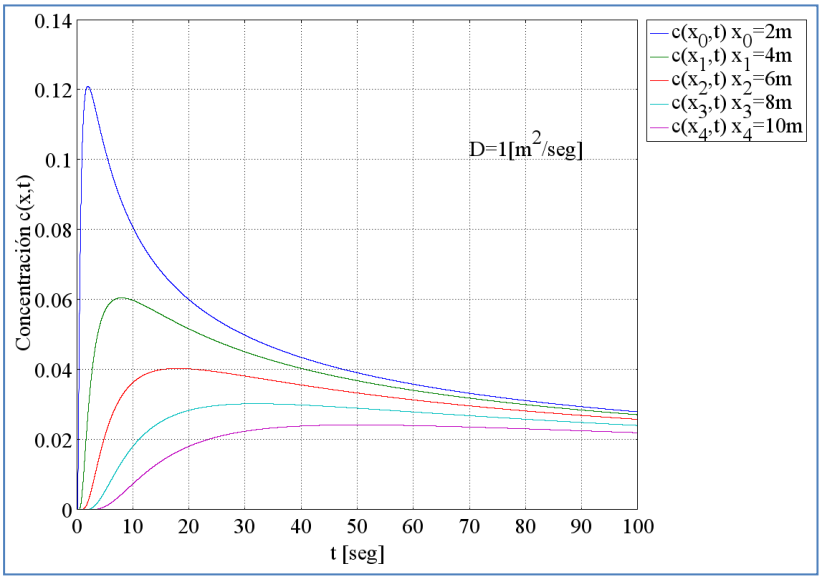


Figura 4C
Concentración Vs Tiempo para diferentes puntos del dominio.

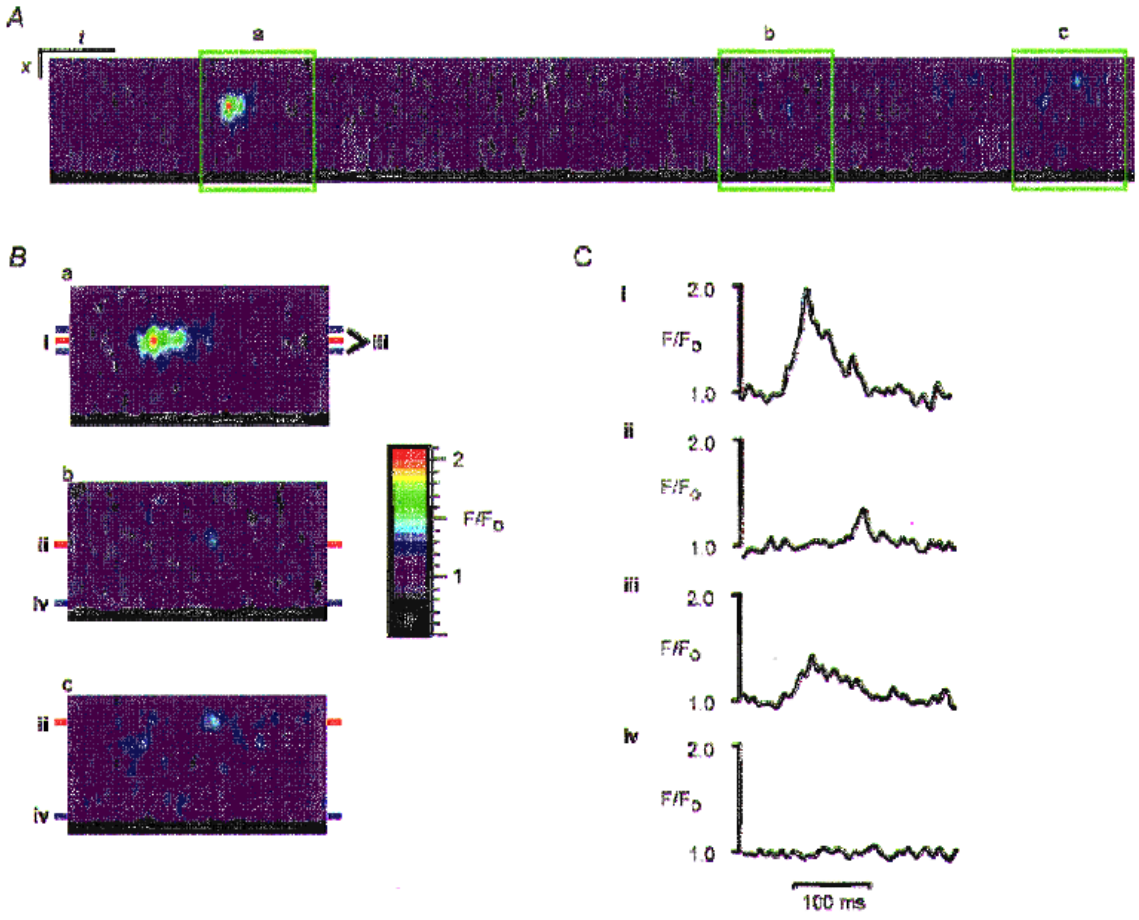


Figura 5: Evolución temporal de [Ca^{2+}] obtenida con microscopía confocal de barrido para diversas locaciones. FUENTE: Gordienko, D., Bolton, T., Cannell, M. Variability in spontaneus subcellular calcium release in guinea-pig ileum smooth muscle cells. J. Physiol 507. No. 3 (1998) pp 707-720.

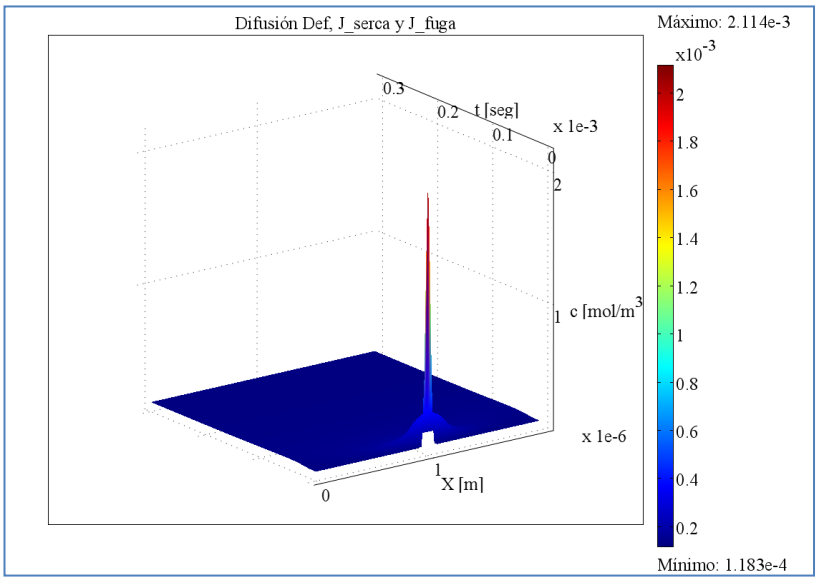


Figura 6A

Concentración de Calmodulina 40 µM. Difusión-Reacción para el disparo del canal central de RyR y la acción de J_{serca} y J_{fuga}.
Concentración en función de la Posición y del Tiempo

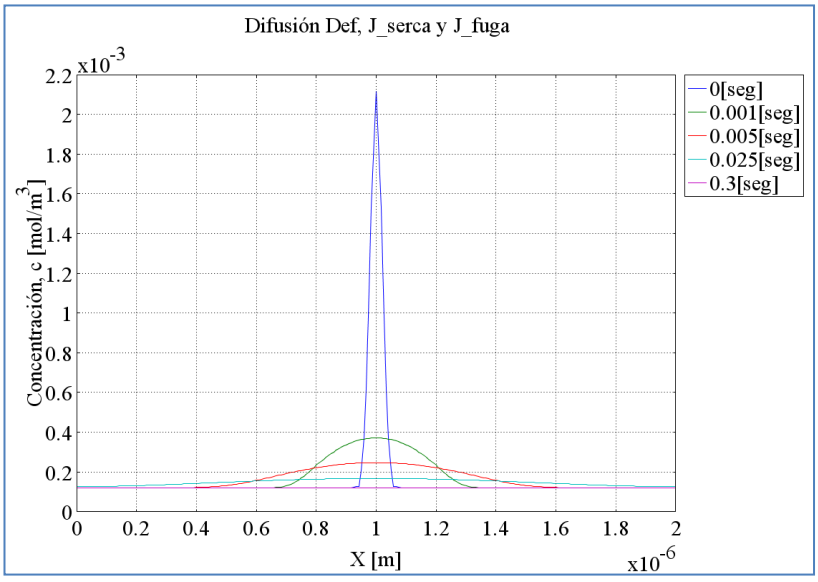


Figura6B

Concentración vs Posición, en tiempos diferentes

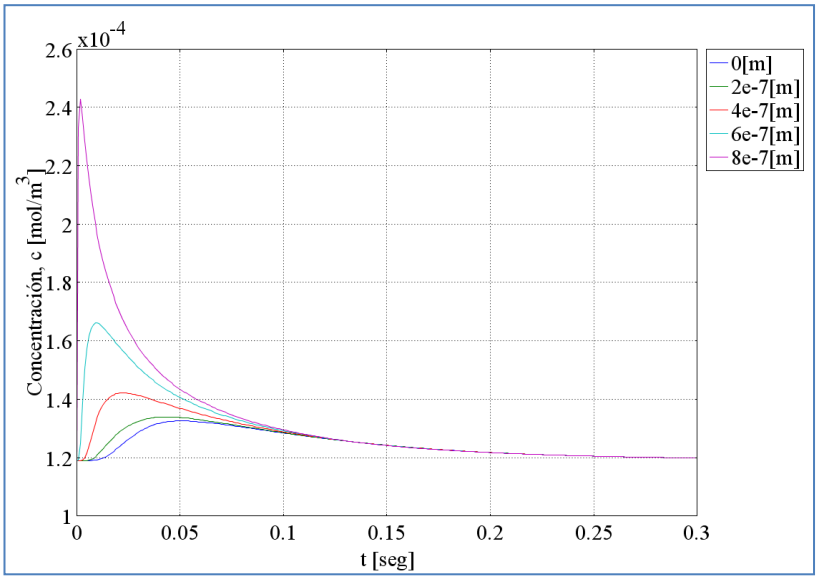


Figura 6C

Concentración vs Tiempo, en puntos diferentes del dominio

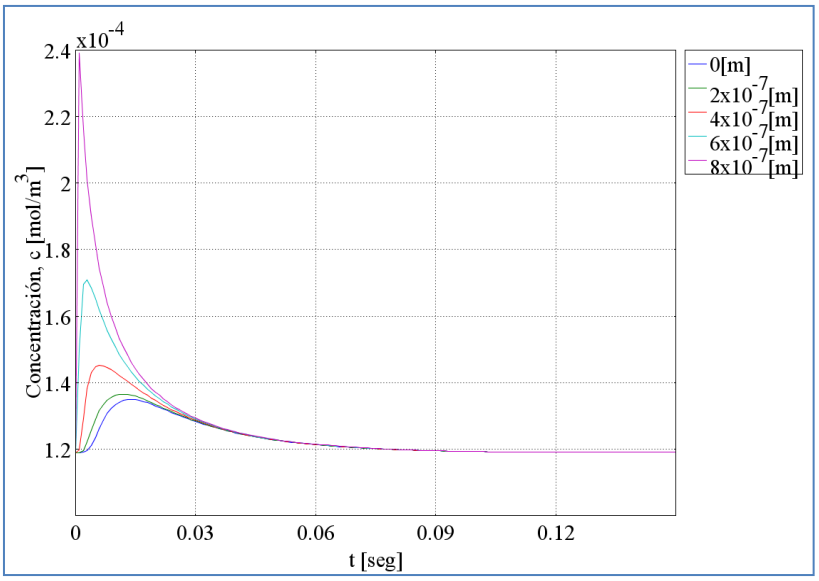


Figura 6D: Concentración de Calmodulina de 10 μM. Difusión-Reacción para el disparo del canal central de RyR y la acción de J_{serca} y J_{fuga}. Concentración vs Tiempo, en puntos diferentes del dominio.

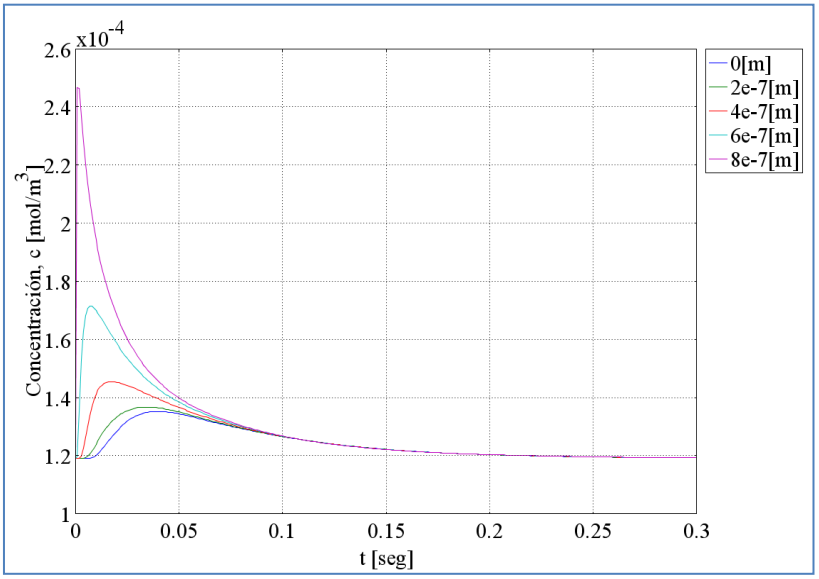


Figura 6E:Concentración de Calmodulina de 30μM Difusión-Reacción para el disparo del canal central de RyR y la acción de J_{serca} y J_{fuga},. Concentración vs Tiempo, en puntos diferentes del dominio

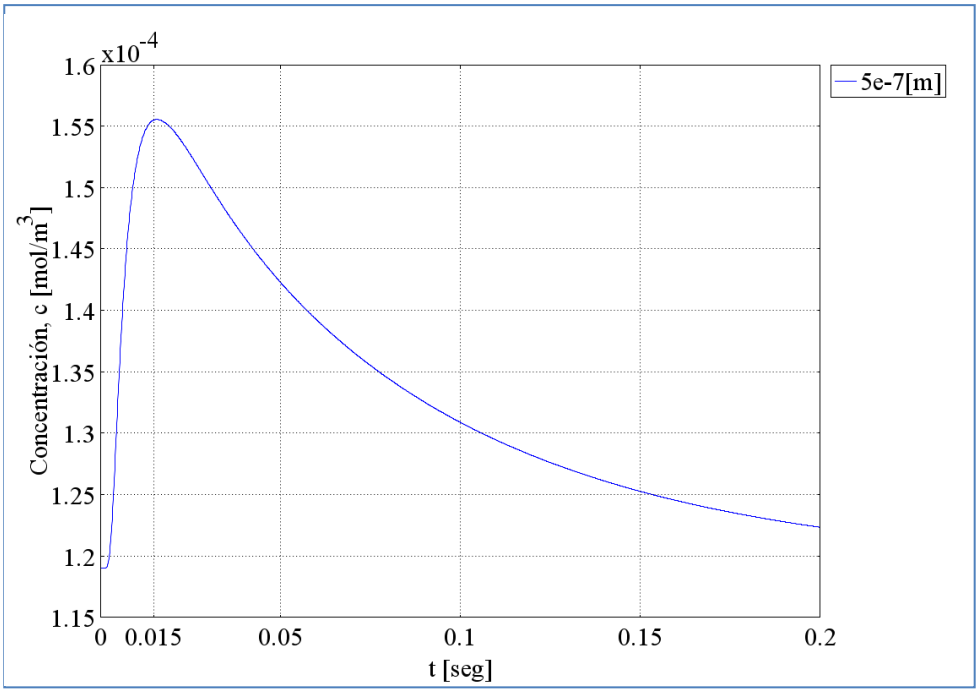


Figura 7: Concentración Vs Tiempo en x = 0.5 µm. Difusión del disparo en t = 0 del canal central de RyR

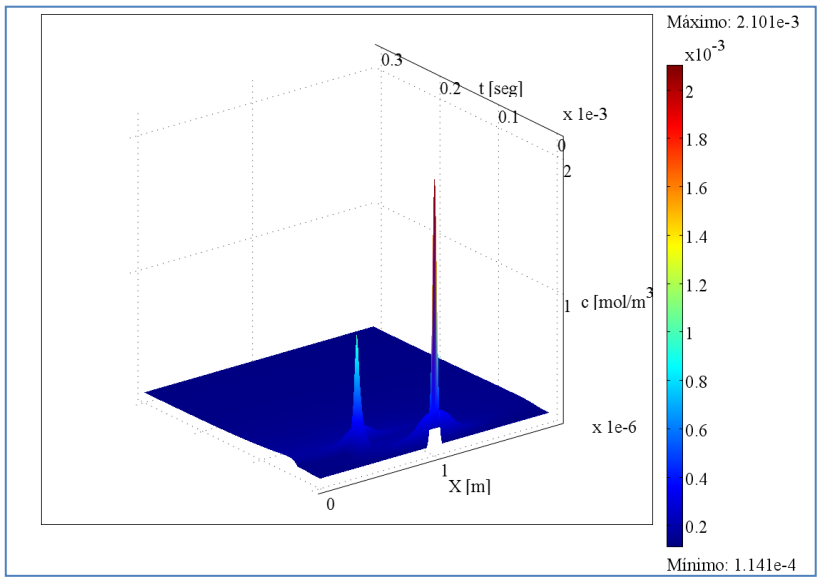


Figura 8A

Difusión-Reacción para el disparo de un canal de RyR activado por la difusión del disparo del canal central en t = 0seg.
Concentración en función de la Posición y del Tiempo

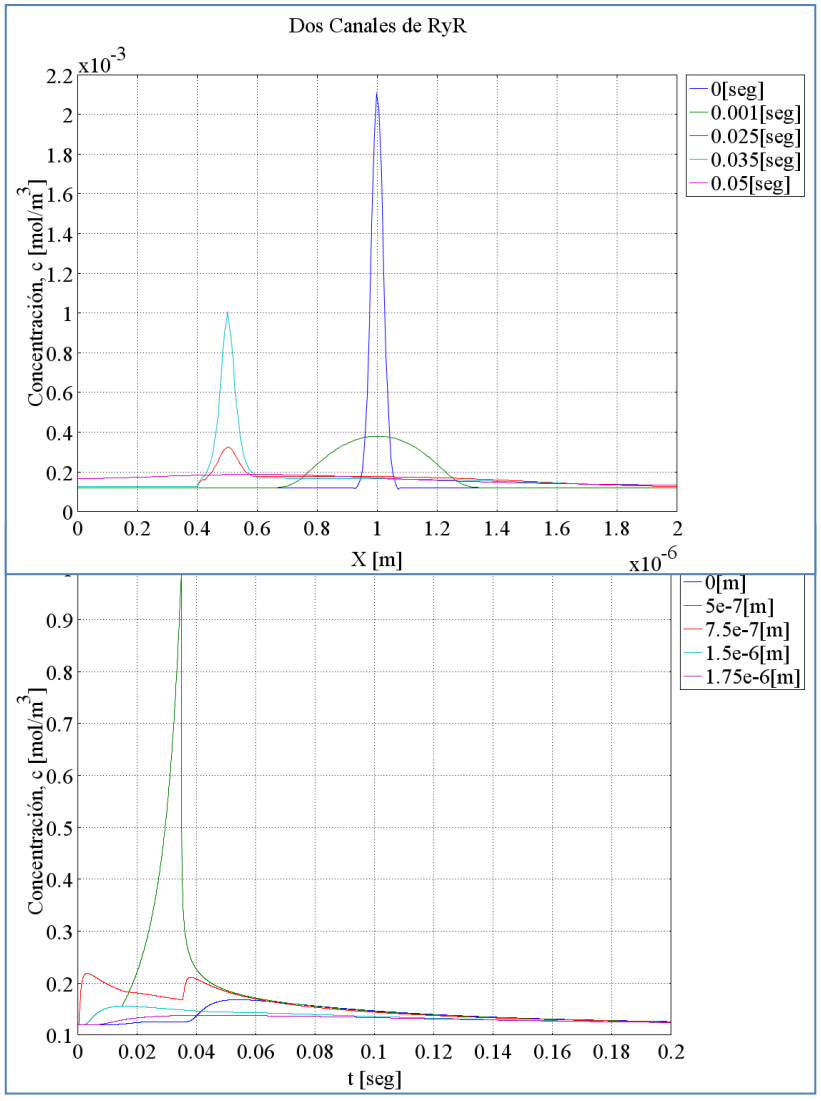


Figura 8B

Concentración vs Posición, en tiempos diferentes

Figura 8C

Concentración vs Tiempo, en puntos diferentes del dominio

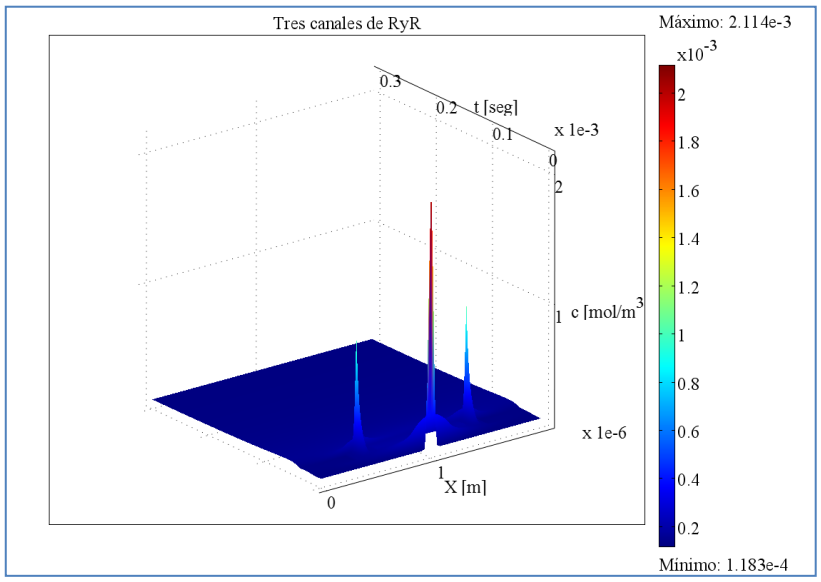
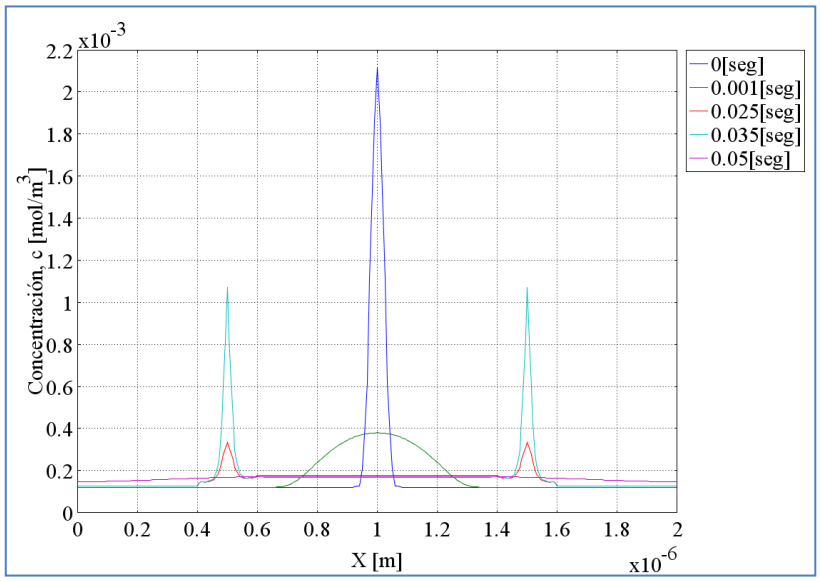


Figura 9A

Difusión-Reacción para el disparo de dos canales de RyR activados por la difusión del disparo del canal central en t = 0 s.

Concentración en función de la Posición y del Tiempo



Figuras 9B

Concentración vs Posición, en tiempos diferentes

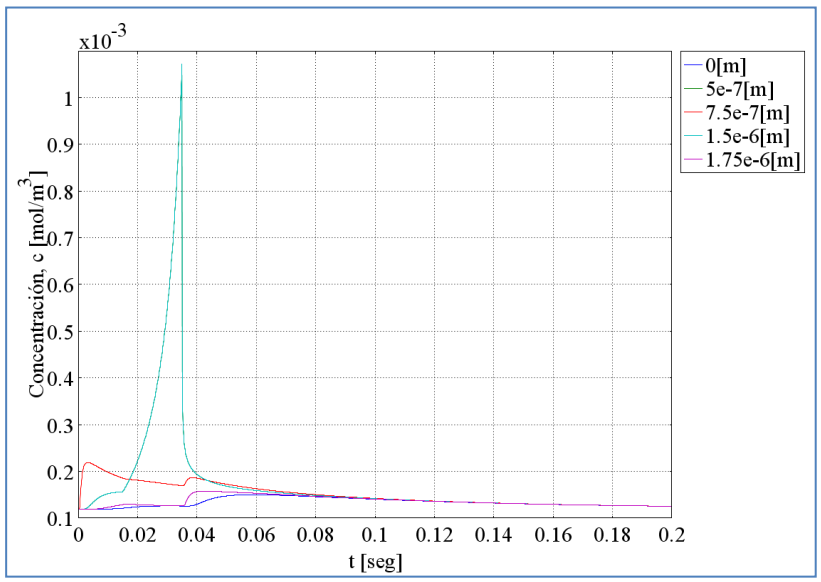


Figura 9C

Concentración vs Tiempo, en puntos diferentes del dominio

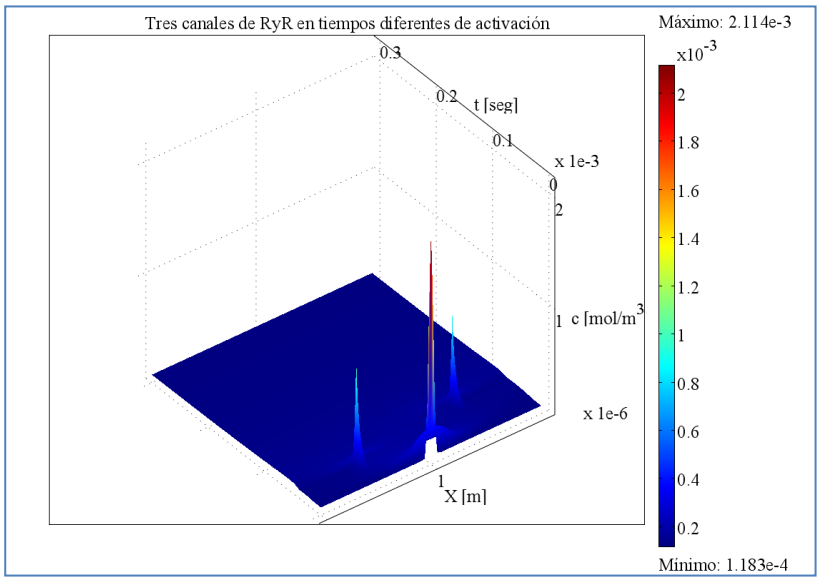


Figura 10A

Concentración de Calmodulina de 40 μM. Difusión-Reacción para el disparo de tres canales de RyR activados en tiempos diferentes.
Concentración en función de la Posición y del Tiempo

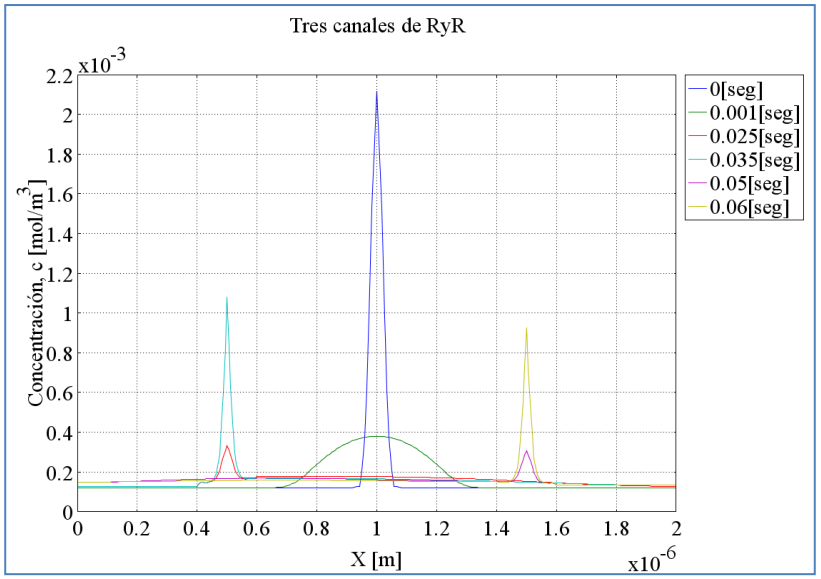


Figura 10B

Concentración vs Posición, en tiempos diferentes

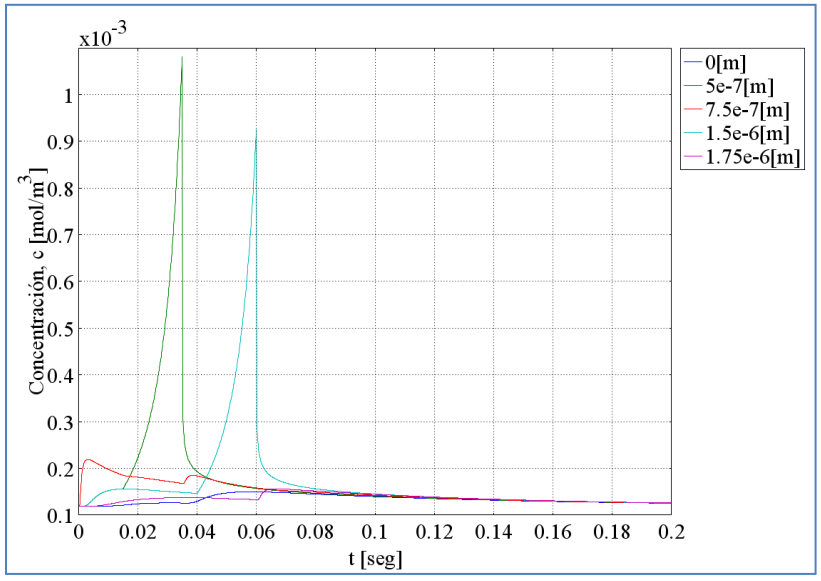


Figura 10C

Concentración vs Tiempo, en puntos diferentes del dominio

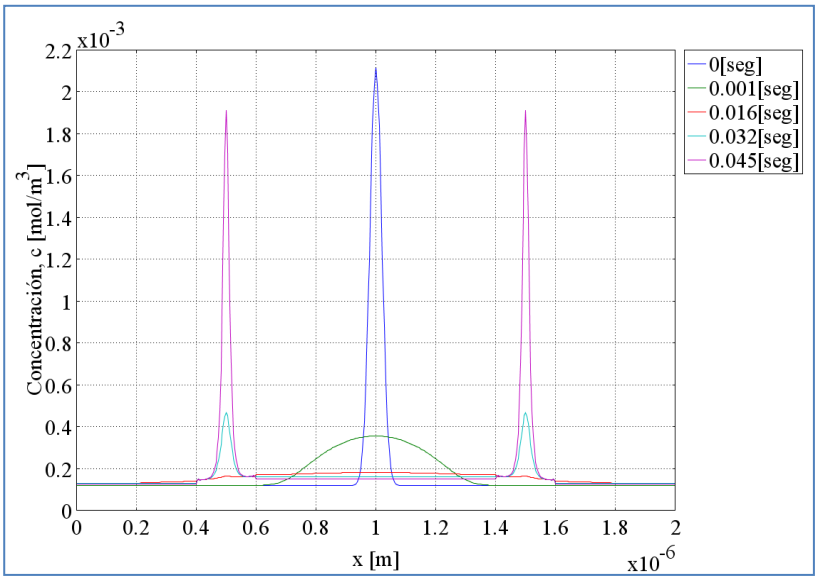


Figura 11A

Difusión-Reacción para el disparo de tres canales de RyR. Concentración de Calmodulina de 30µM. Concentración vs Posición, en tiempos diferentes

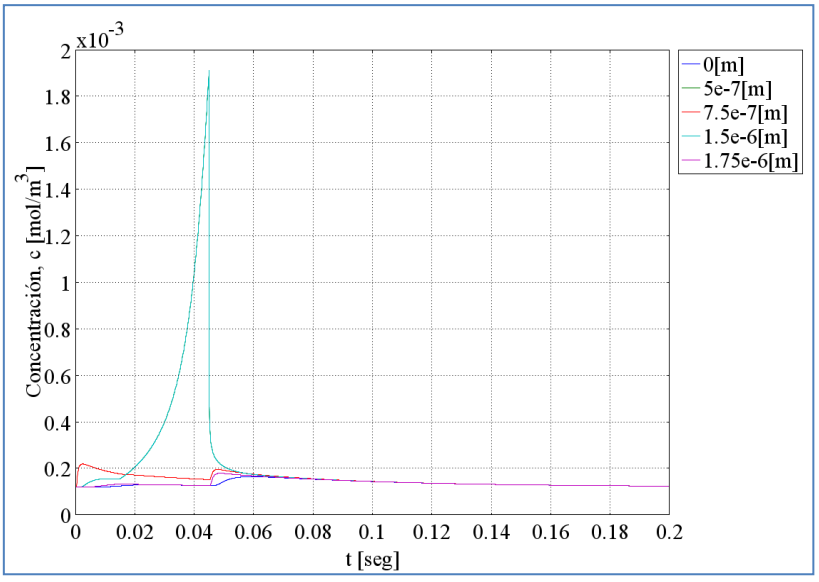


Figura 11B

Concentración vs Tiempo, en puntos diferentes del dominio

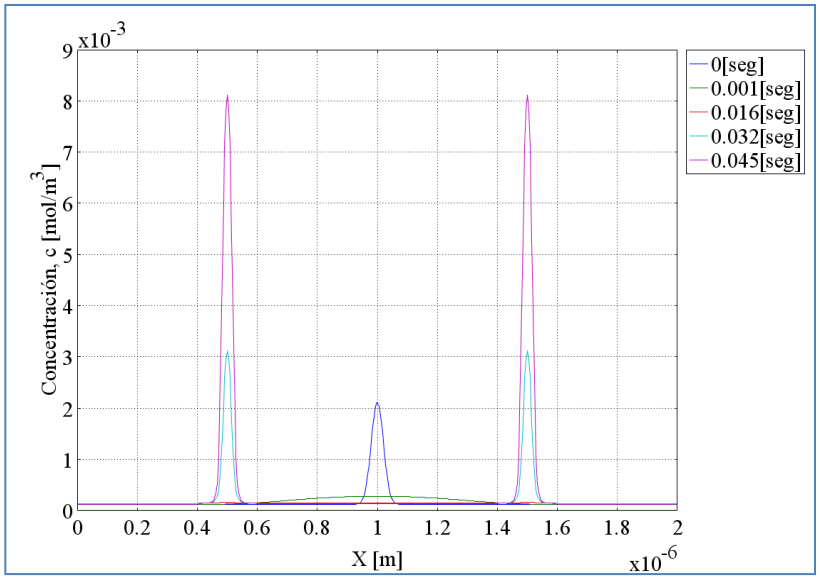


Figura12A

Difusión-Reacción para el disparo de tres canales de RyR; Concentración de Calmodulina 10µM. Concentración vs Posición, en tiempos diferentes

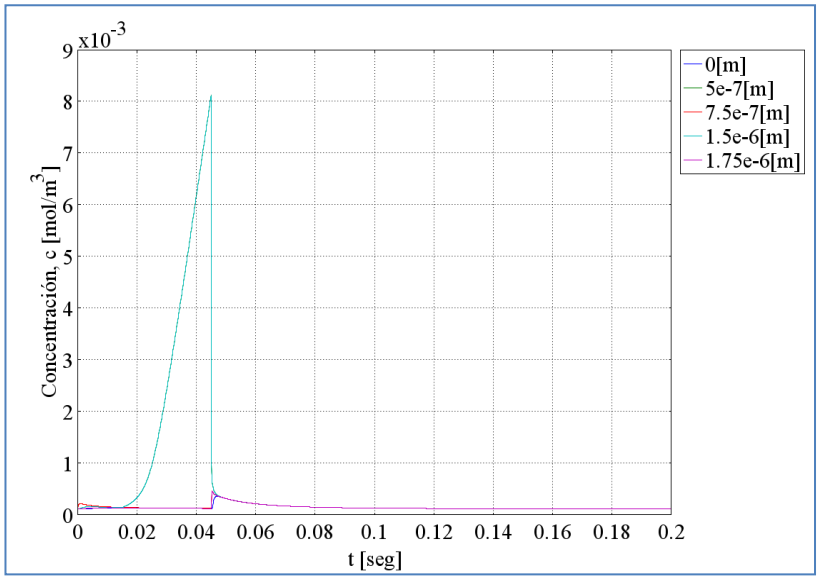


Figura12B

Concentración vs Tiempo, en puntos diferentes del dominio

Cuadro 1: Valores y expresiones de las constantes utilizadas.

Nombre	Expresión	Valor	Descripción
σ_x	2e-8[m]	(2×10^{-8})[m]	Ajuste Ancho de la Gaussiana
A_x	1e-10[mol/m^2]	(1×10^{-10})[mol/m^2]	Intensidad de la Liberación Impulsiva de Ca^{2+}
L	2e-6[m]	(2×10^{-6})[m]	Longitud del dominio de la simulación
Aefec	A /(sqrt(2*pi)*sigma)	0.001995[mol/m^3]	Prefactor gaussiano
DCa	223e-12[m^2/s]	(2.23×10^{-10})[m^2/s]	Coeficiente de Difusión del Ca^{2+} libre
cbasal	1.19e-4[mol/m^3]	(1.19×10^{-4})[mol/m^3]	Concentración de Ca^{2+} basal
R	0.5[mol/(m^3*s)]	0.5[mol/(m^3·s)]	Factor J_{SERCA}
x_0	L/2	(1×10^{-6})[m]	Ubicación del centro de la gaussiana0
x_1	L/4	(5×10^{-7})[m]	Ubicación del centro de la gaussiana1
x_2	L*3/4	(1.5×10^{-6})[m]	Ubicación del centro de la gausisana2
B_t	40e-3[mol/m^3]	0.04[mol/m^3]=40 μM	Concentración total de Calmodulina
K_d	1e-4[mol/m^3]	(1×10^{-4})[mol/m^3]=0,1μM	Constante de disociación Calmodulina
K	1e-4[mol/m^3]	(1×10^{-4})[mol/m^3]=0,1μM	Concentración de Ca^{2+} a la cual $J_{SERCA}=J_{máx}/2$